

T.P. DE AULA N° 3**TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO EN CLOROPLASTOS
FOTOFOSFORILACIÓN****OBJETIVOS**

- Comprender las reacciones de óxido-reducción del transporte de electrones fotoinducido en el cloroplasto.
- Diferenciar el transporte electrónico fotoinducido abierto (no cíclico) del cerrado (cíclico).
- Analizar las reacciones de síntesis de ATP inducidas por la luz, o fotofosforilación, acopladas al transporte electrónico cloroplástico.
- Comparar la fosforilación oxidativa mitocondrial con la fotofosforilación cloroplástica, tomando como base el principio unificador de la teoría quimiosmótica.
- Relacionar el transporte electrónico fotoinducido con las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

INTRODUCCIÓN

La captación de la energía solar por los organismos autótrofos y su conversión en energía química de compuestos orgánicos reducidos, es la fuente fundamental de casi toda la energía biológica. Los organismos fotosintéticos atrapan la energía solar para formar ATP y NADPH (reacciones luminosas de la fotosíntesis), que luego utilizan como fuente de energía para fabricar glúcidos y otros compuestos orgánicos a partir de CO₂ y H₂O (reacciones de fijación del carbono de la fotosíntesis); de forma simultánea desprenden O₂ a la atmósfera.

Las cianobacterias y las plantas poseen dos centros de fotorreacción diferentes que funcionan consecutivamente. La ruptura del H₂O impulsada por la luz está catalizada por un complejo proteico que contiene Mn y conduce simultáneamente a la liberación de O₂. El centro de reacción del fotosistema II de plantas P680, al ser excitado por la luz pasa electrones a la plastoquinona y los electrones perdidos del P680 son reemplazados por electrones captados del H₂O. La plastoquinona reducida transporta electrones al complejo del citocromo *b₆f*; desde allí los electrones pasan a la plastocianina y a continuación al P700 (centro de reacción fotosistema I) donde reemplazan a los electrones que se han perdido por fotoexcitación. El fotosistema I

pasa electrones desde su centro de reacción excitado, y a través de varios transportadores, a la ferredoxina que finalmente reduce el NADP^+ a NADPH.

El flujo de electrones desde el complejo del citocromo b_6f impulsa los protones a través de la membrana del tilacoide, los cuales junto con los protones liberados por la lisis del H_2O colaboran en formar un gradiente y un espacio ácido en el interior del tilacoide. El regreso hacia el estroma por canal de protones genera una fuerza protón-motriz que proporciona la energía para la síntesis de ATP por una ATP sintasa.

El flujo de los electrones a través de los fotosistemas produce NADPH y ATP, en una relación 2:3. Un segundo flujo de electrones, el *flujo cíclico*, sólo produce ATP y permite variaciones en las proporciones de NADPH y ATP formados.

Los cloroplastos, al igual que las mitocondrias, evolucionaron a partir de bacterias que vivían endosimbióticamente dentro de células eucariotas primitivas. Las ATP sintasas de eubacterias, cianobacterias, mitocondrias y cloroplastos comparten un precursor y un mecanismo enzimático común.

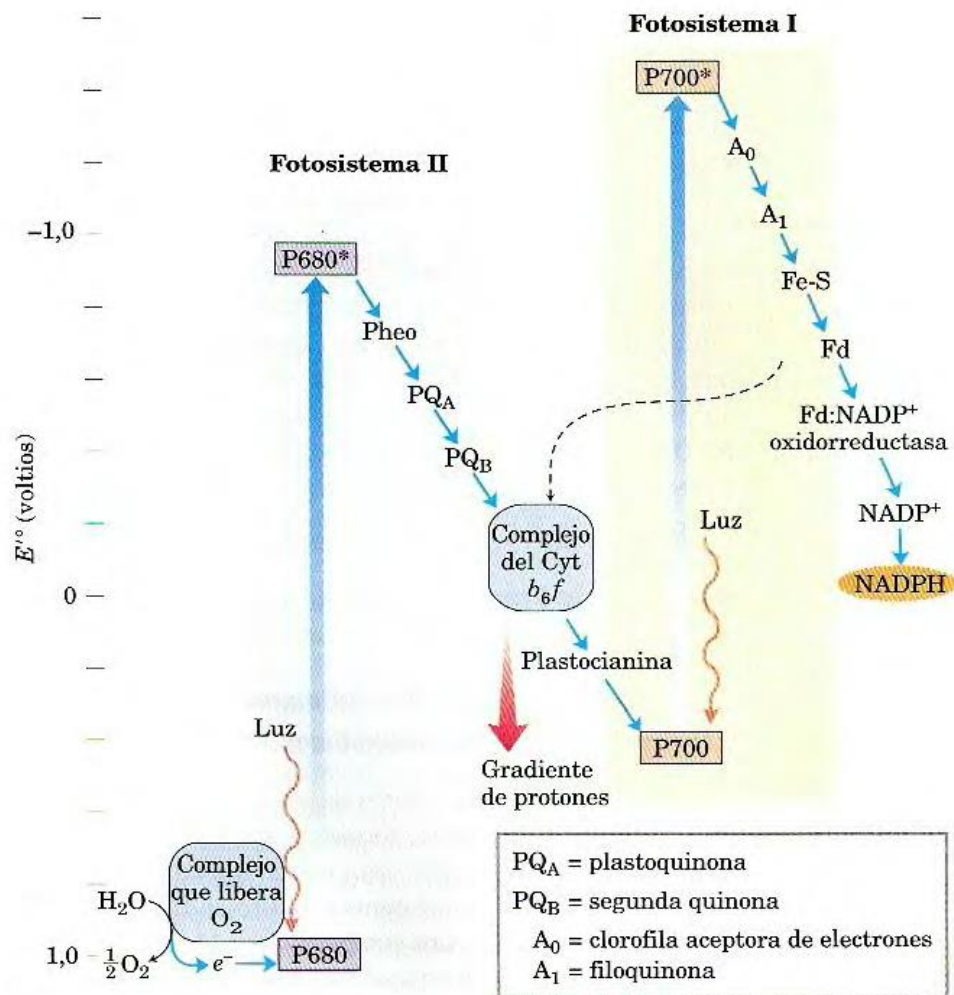


Fig.7: Esquema en “Z” o ruta del transporte electrónico no cíclico en el cloroplasto: Integración del Fotosistema I y II desde el H_2O para producir NADPH. La flecha negra a trazos muestra la ruta de la transferencia cíclica de electrones en la que sólo interviene el Fotosistema I.
 Pheo: feofitina. Fe-S: proteína ferrosulfurada. Fd: ferredoxina
 Extraído de Lehninger A.L., Nelson D., Cox M., “Principios de Bioquímica”, 2006.

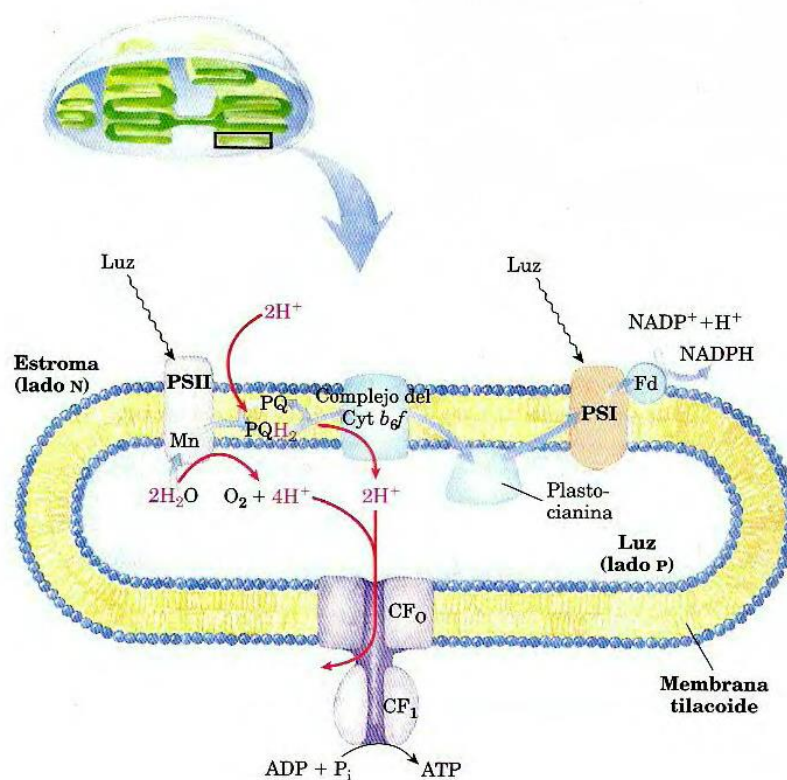


Fig. 8: Síntesis de ATP por fotofosforilación. Circuitos de protones y electrones en los tilacoides. Los electrones (flechas azules) se desplazan desde el H_2O hasta el PSII, la cadena de transportadores intermedios y el PSI hasta el NADP^+ . Los protones (flechas rojas) se bombean a la luz del tilacoide por el flujo de electrones a través de la cadena de transportadores de electrones entre PSII y PSI, y vuelven a entrar en el estroma a través de canales protónicos formados por la porción F_0 (designada CF_0) de la ATP sintasa. La subunidad F_1 (CF_1) cataliza la síntesis de ATP.

PSI: fotosistema I.

PSII: fotosistema II

Extraído de Lehninger A.L., Nelson D., Cox M., "Principios de Bioquímica", 2006.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

- 1) La investigación sobre una cadena de transporte de electrones en las células de las hojas de espinaca ha revelado la presencia de una serie de moléculas transportadoras de electrones reversibles, que poseen los potenciales estándar de reducción que se indican.

Forma reducida	Forma oxidada	E' ₀ V
citocromo b ₆ (Fe ²⁺)	citocromo b ₆ (Fe ³⁺)	- 0.060
citocromo f (Fe ²⁺)	citocromo f (Fe ³⁺)	+ 0.365
ferredoxina (reducida)	ferredoxina (oxidada)	- 0.432
sustrato reductor de ferredoxina (red.)	SRF (oxidado)	- 0.600
plastocianina (reducida)	plastocianina (oxidada)	+ 0.400

Predecir la secuencia probable de estos transportadores de electrones en esta cadena de transporte electrónico, basándose en sus potenciales de reducción estándar.

¿Qué etapas de la cadena es “improbable” que proporcionen suficiente energía libre, en las condiciones estándar, para producir una molécula de ATP por par de electrones transferido?

- 2) **Eficiencia fotoquímica de la luz de diferentes longitudes de onda.** La velocidad de fotosíntesis, medida según la producción de oxígeno, es mayor cuando una planta se ilumina con luz de 680 nm de longitud de onda que con luz de 700 nm. Pero la iluminación con una combinación de 680 nm y 700 nm da una velocidad de fotosíntesis mayor que la de cualquiera de las dos longitudes de onda por separado. Explíquelo.

- 3) **Acción de un herbicida.** Cuando se tratan los cloroplastos con 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea, (DCMU o Diuron), un herbicida potente, cesan el desprendimiento de O₂ y la fotofosforilación. Puede restablecerse el desprendimiento de O₂, pero no la fotofosforilación por adición de un aceptor electrónico externo, es decir, un reactivo de Hill. ¿Cómo actúa este herbicida? Sugiera la localización del sitio del inhibidor de este herbicida teniendo en cuenta el esquema “Z” de la ruta del flujo electrónico desde el H₂O.

- 4) **Función de la fotofosforilación cíclica.** Cuando la relación [NADPH] / [NADP⁺] en los cloroplastos es elevada, la fotofosforilación se vuelve predominantemente cíclica. ¿Se desprende O₂ durante la fotofosforilación cíclica? ¿Se produce NADPH? Explíquelo. ¿Cuál es la función principal de la fotofosforilación en esta situación?

5) Luego de leer e interpretar los siguientes textos, complete las actividades propuestas:

Fosforilación oxidativa mitocondrial y fotofosforilación cloroplástica

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. La fotofosforilación es el mecanismo mediante el cual los organismos fotosintéticos captan la energía de la luz solar, la fuente fundamental de energía de la biosfera, y la utilizan para sintetizar ATP. La fosforilación oxidativa y la fotofosforilación aportan conjuntamente la mayor parte del ATP sintetizado por la mayor parte de los organismos la mayor parte de las veces.

En los eucariotas la fosforilación oxidativa tiene lugar en las mitocondrias y la fotofosforilación en los cloroplastos. La fosforilación oxidativa produce la *reducción* de O_2 a H_2O gracias a los electrones cedidos por el NADH y el $FADH_2$ y tiene lugar tanto en la luz como en la oscuridad. La fotofosforilación produce la *oxidación* de H_2O a O_2 con $NADP^+$ como aceptor electrónico fundamental y depende absolutamente de la energía de la luz. A pesar de sus diferencias, estos dos procesos convertidores de la energía altamente eficaces transcurren a través de mecanismos muy similares.

Nuestros conocimientos actuales sobre la síntesis del ATP en las mitocondrias y en los cloroplastos se basan en la hipótesis, introducida por Peter Mitchell en 1961, según la cual las diferencias transmembrana en la concentración de protones son el reservorio de la energía obtenida a partir de las reacciones biológicas de oxidación. Esta **teoría quimiosmótica** está actualmente aceptada como uno de los grandes principios unificadores de la biología del siglo xx. Proporciona un conocimiento de los procesos de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación así como de transducciones de energía aparentemente tan dispares como son el transporte activo a través de membranas y el movimiento de los flagelos bacterianos.

Existen tres aspectos mecanísticamente similares entre la oxidación fosforilativa y la fotofosforilación. (1) En ambos procesos interviene un flujo de electrones a través de una cadena de transportadores ligados a membrana. (2) La energía libre puesta a disposición por este flujo de electrones “cuesta abajo” (exergónico) está acoplada al transporte “cuesta arriba” de protones a través de una membrana impermeable a los protones, conservándose la energía libre de oxidación de los combustibles metabólicos en forma de potencial electroquímico transmembrana (p. 391). (3) El flujo transmembrana de protones a favor de su gradiente de concentración mediante canales proteicos específicos proporciona la energía libre para la síntesis de ATP, catalizada por un complejo proteico asociado a la membrana (la ATP sintasa) que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ATP.

Extraído de Lehninger A.L., Nelson D., Cox M., “Principios de Bioquímica”, 2006.

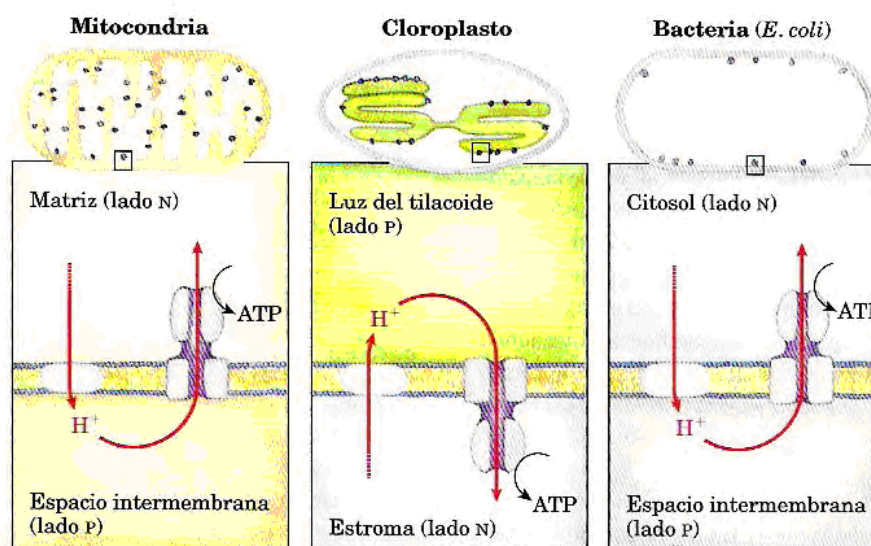
La ATP sintasa de los cloroplastos es como la de las mitocondrias

El enzima responsable de la síntesis de ATP en los cloroplastos es un gran complejo con dos componentes funcionales, CF_o y CF_1 (la C denota la localización, los cloroplastos). CF_o es un poro protónico transmembrana compuesto por varias proteínas integrales de membrana y es homólogo al F_o mitocondrial. CF_1 es un complejo de proteína periférica de membrana muy similar en composición de subunidades, estructura y función al F_1 mitocondrial.

La microscopia electrónica de cloroplastos seccionados muestra complejos de ATP sintasa en forma de proyecciones en forma de pomo en la superficie *externa* (del estroma o N) de las membranas tilacoides que se corresponden con los complejos de ATP sintasa que se proyectan sobre la superficie *interna* (matriz o N) de la membrana mitocondrial interna. Así, la relación entre la orientación de la ATP sintasa y la dirección del bombeo de protones es la misma en los cloroplastos y en las mitocondrias. En ambos casos la porción F_1 de la ATP sintasa está localizada en el lado más alcalino (N) de la membrana a través de la que fluyen los protones a favor de su gradiente de concentración; la dirección del flujo de protones en relación a F_1 es la misma en ambos casos: de P a N (Fig. 19-58).

Se cree que el mecanismo de la ATP sintasa de cloroplastos es también esencialmente idéntico al de su análogo mitocondrial; ADP y P_i se condensan fácilmente para formar ATP sobre la superficie del enzima y la liberación de este ATP ligado al enzima requiere una fuerza protón-motriz. La catálisis rotacional ocupa secuencialmente cada una de las tres subunidades β de la ATP sintasa en la síntesis de ATP, liberación de ATP y unión de $ADP + P_i$ (Figs. 19-24, 19-25).

Extraído de Lehninger A.L., Nelson D., Cox M., "Principios de Bioquímica", 2006.



Comparación de la topología del movimiento de protones y orientación de la ATP sintasa en las membranas mitocondriales, de cloroplastos y de la bacteria *E. coli*. En cada caso, la orientación del gradiente de protones con respecto a la ATPsintasa es la misma.

Extraído de Lehninger A.L., Nelson D., Cox M., "Principios de Bioquímica", 2006.

Actividades Propuestas:

- A) Con los antecedentes bibliográficos compare: el proceso de Transporte Electrónico y Síntesis de ATP acoplada, en la mitocondria y en el cloroplasto.
- B) Genere un cuadro comparativo, en el que se resuman al menos:
 - a. Tres **diferencias** fundamentales entre el transporte electrónico y la síntesis de ATP acoplada, en la mitocondria y en el cloroplasto
 - b. Tres **similitudes** mecánicas entre la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación, basándose en el principio unificador de la teoría quimiosmótica de Mitchell (1961).

GUÍA DE ESTUDIO

Transporte electrónico fotoinducido en el cloroplasto

Fotosíntesis - Reacciones luminosas

Organismos en los que ocurre.

Localización celular, pigmentos principales y accesorios.

¿Cómo están organizados y relacionados los Fotosistemas I y II?

¿Cuáles son las diferencias entre el flujo de electrones cíclico y no cíclico?- En qué condiciones celulares ocurren.

Síntesis de ATP fotoinducida

¿Cómo se hace posible el proceso de fotofosforilación en el cloroplasto?

Compare y abstraiga las principales diferencias y semejanzas entre el flujo de electrones fotoinducido en el cloroplasto y la cadena de transporte electrónico mitocondrial, basándose en el principio unificador de la Teoría Quimiosmótica.

T.P. DE AULA N° 4**METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. VÍA GLICOLÍTICA****OBJETIVOS**

- Conocer y entender las vías que utilizan los organismos para obtener energía y poder reductor a partir de los carbohidratos, principalmente desde la glucosa.
- Comprender los procesos de regulación de las rutas metabólicas de los carbohidratos.

INTRODUCCIÓN

La glucosa es el principal combustible de la mayor parte de los organismos. Este compuesto tiene la propiedad de ser muy rico en energía y puede ser movilizado rápidamente, desde la reserva de glucógeno, cuando el organismo sufre demandas rápidas de energía.

La vía glicolítica o glucólisis es la ruta principal del catabolismo de la glucosa, y se lleva a cabo no solamente en plantas y animales, sino también en muchos microorganismos.

Durante la vía glicolítica una molécula de glucosa, que posee seis átomos de carbono, se degrada enzimáticamente a través de una secuencia de reacciones para dar dos moléculas de piruvato, que poseen tres átomos de carbono cada una. Durante esta secuencia de reacciones gran parte de la energía liberada se conserva en forma de ATP.

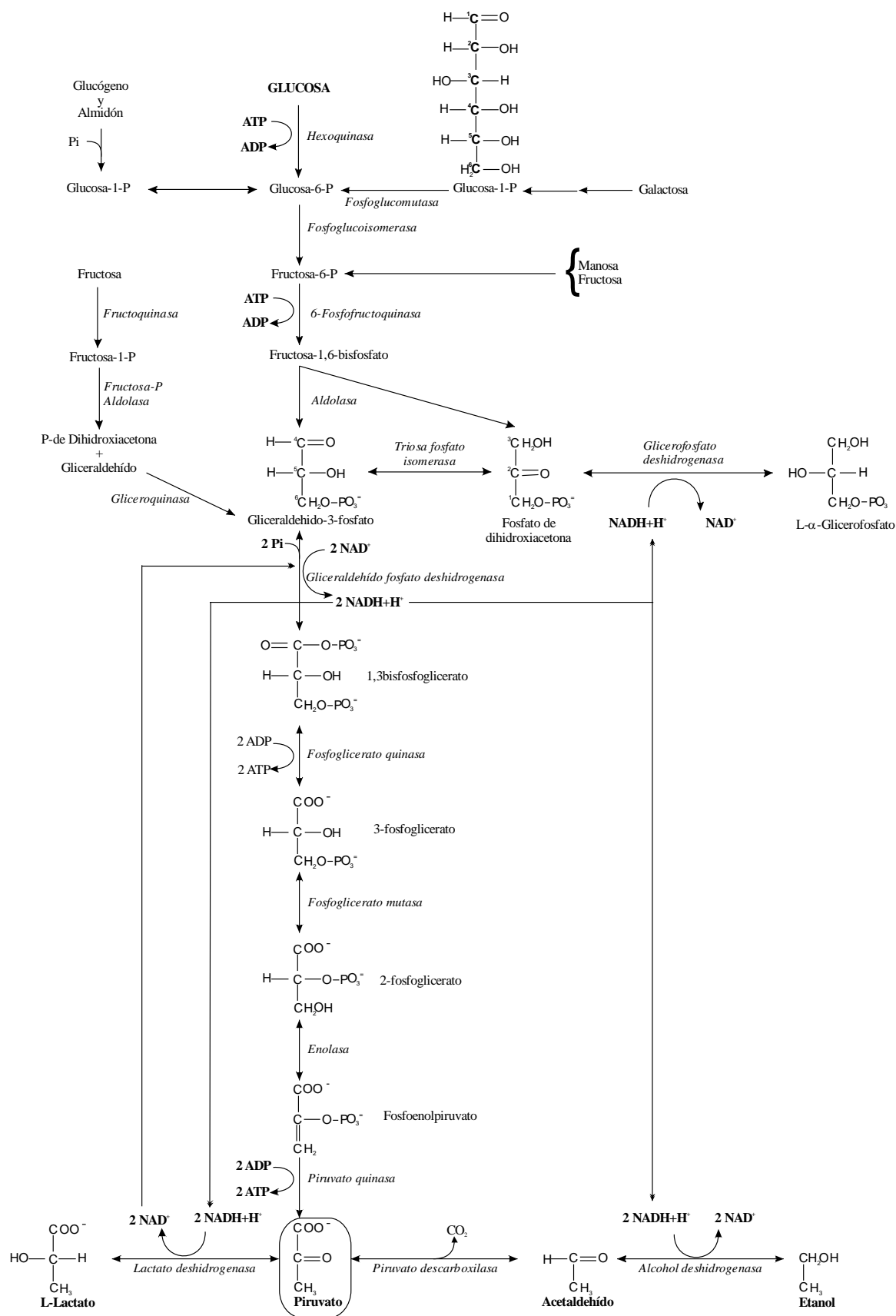
Tres son las rutas importantes que puede seguir el piruvato después de la glucólisis:

En *aerobiosis* el piruvato producido en la glucólisis ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí en una primera instancia a acetil-CoA, y finalmente a CO₂ y H₂O.

En *anaerobiosis* el piruvato puede ser reducido a lactato o etanol, de acuerdo al tipo celular, mediante procesos conocidos en general como *fermentaciones*.

En la mayor parte de las células las enzimas que participan en la vía glicolítica se encuentran localizadas en el citosol, en tanto que las enzimas que participan en los procesos de oxidación de carbohidratos que requieren de consumo de oxígeno se encuentran localizadas en las mitocondrias celulares.

Casi todas las enzimas de la vía glicolítica requieren magnesio (Mg⁺²) para ejercer su actividad.



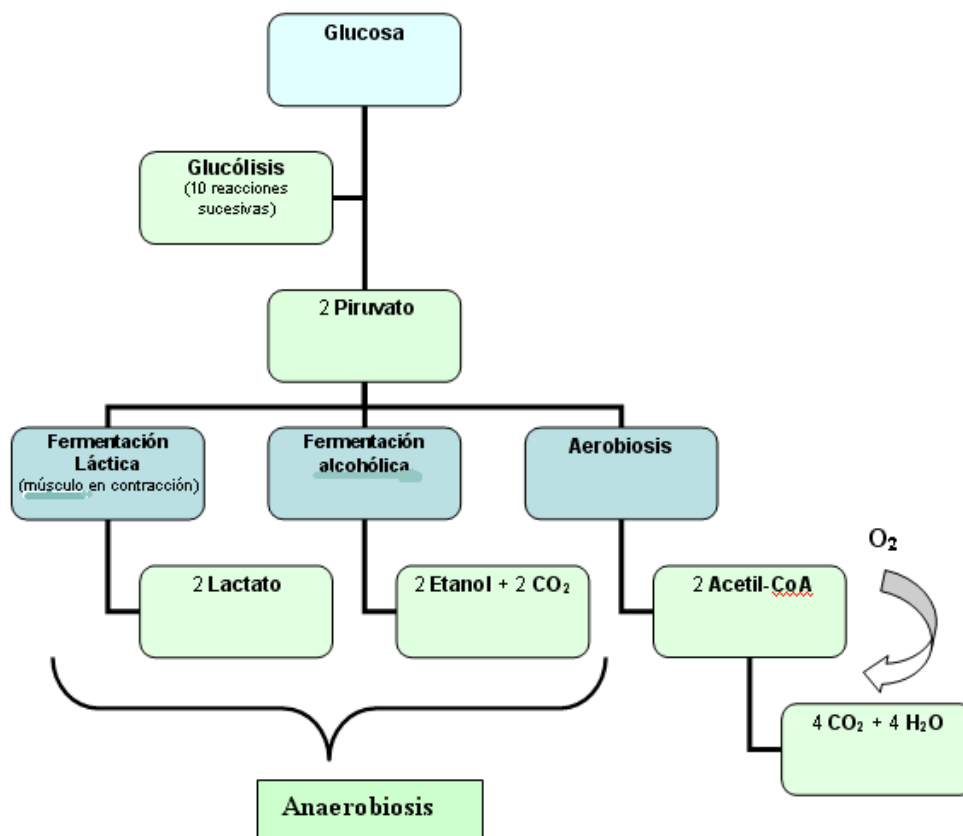


Fig. 11. Esquema de los destinos de piruvato en condiciones anaeróbicas y aeróbicas

Durante la glucólisis tienen lugar tres etapas de transformaciones químicas:

- 1- Degradación del esqueleto carbonado de glucosa para transformarse en piruvato.
- 2- Fosforilación del ADP por fosfatos de elevada energía, formados durante la glucólisis.
- 3- Transferencia de átomos de hidrógeno o de electrones.

Es importante observar que los compuestos que participan en la vía glicolítica son fosforilados, y las funciones de esos grupos fosfatos son tres:

1- Los grupos fosfatos se hallan completamente ionizados a pH 7, con lo que confieren carga negativa a cada uno de los intermediarios de la vía. Como las membranas celulares son generalmente impermeables a las moléculas que poseen una carga eléctrica, los intermediarios glicolíticos no pueden salir de la célula. La glucosa puede ingresar a la célula, y el lactato y el piruvato pueden salir de ella, solamente porque en la membrana celular existen sistemas de transporte específicos que permiten estos pasajes.

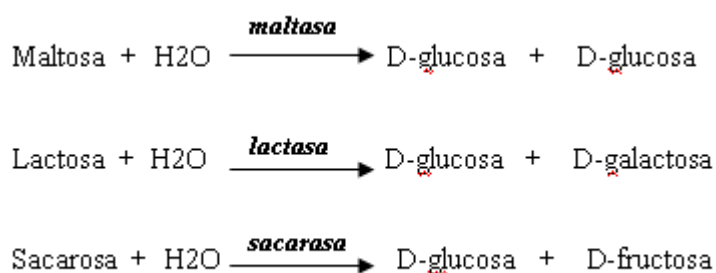
2- Son compuestos esenciales en la conservación de la energía metabólica, ya que en último término son transferidos al ADP para dar ATP.

3- Los grupos fosfatos sirven de unión para el acoplamiento adecuado de los intermediarios glicolíticos a los sitios activos de las enzimas correspondientes.

Rutas de “alimentación” que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, muchos carbohidratos se incorporan a la vía glicolítica para experimentar degradación que rinde energía, por ejemplo los monosacáridos fructosa, galactosa y manosa.

Los disacáridos (maltosa, sacarosa y lactosa) no pueden ser incorporados directamente a la vía glicolítica. Una vez ingeridos deben experimentar hidrólisis enzimática en las células que recubren las paredes del intestino delgado, para ser transformados en monosacáridos.



Los monosacáridos así formados son absorbidos a la sangre y pasan al hígado, en donde se convierten en intermediarios de la secuencia glicolítica.

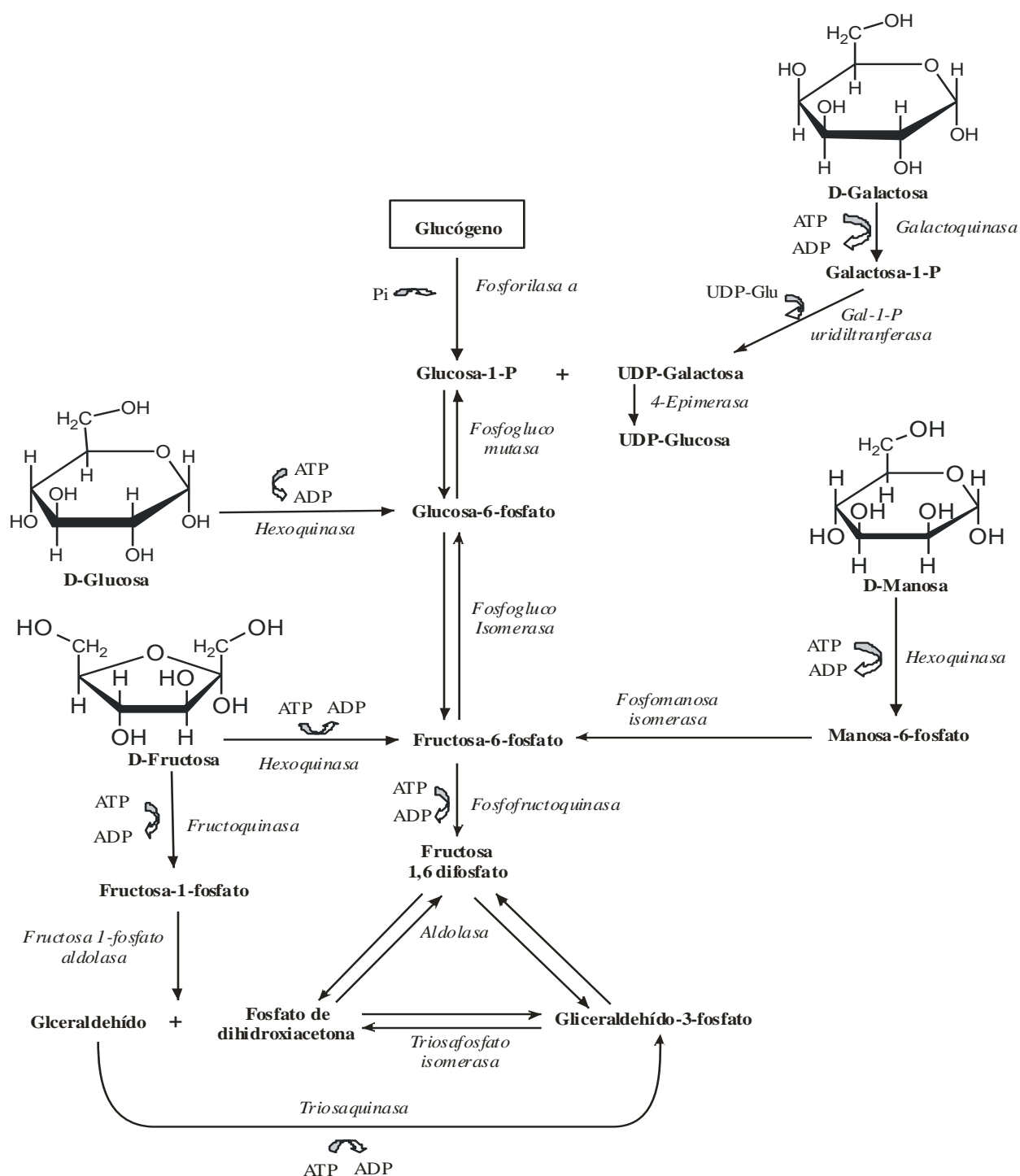


Fig. 12: Esquema de la incorporación de distintos monosacáridos a la Vía Glicolítica.

Puntos de Regulación de la Glicólisis.

Como en todas las rutas metabólicas la velocidad de la glicólisis está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas, donde están involucradas reacciones químicas irreversibles:

1° Punto de Control: a nivel de la *Hexoquinasa*. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, la glucosa-6-fosfato, el cual modula negativamente la actividad de la enzima.

2° Punto de Control: a nivel de la *Fosfofructoquinasa* la cual es una enzima alostérica cuya actividad es regulada por varios efectores. Son moduladores alostéricos positivos de la actividad de esta enzima el **ADP** y el **AMP**, y la modulan negativamente el **ATP**, **NADH**, **citrato** y **los ácidos grasos de cadena larga**. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

3° Punto de Control: a nivel de la *Piruvato quinasa*. Esta enzima alostérica que posee varias isoenzimas, es modulada positivamente por la fructosa-1,6- bifosfato y negativamente por el ATP, acetyl-CoA y ácidos grasos de cadena larga, entre otros. La isoenzima hepática también es regulada por fosforilación reversible.

La regulación de la vía glicolítica explica el llamado “**Efecto Pasteur**”, el cual está basado en la regulación alostérica de las enzimas de la vía ejercida por los niveles de ciertos metabolitos que reflejan el equilibrio entre la producción y el consumo de ATP, adecuando de este modo la actividad glicolítica a las necesidades energéticas celulares.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

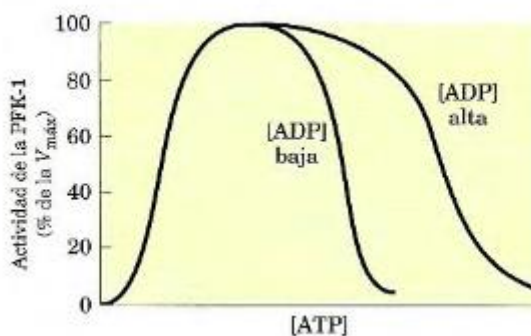
1) Predecir si la adición de cantidades significativas de los compuestos que se especifican a continuación podría provocar un incremento (+), disminución (-), o no inducir ningún cambio en la velocidad de conversión de glucosa en etanol. ¿Cuál es su modo de acción?

- a) citrato
- b) ADP
- c) fluoruro

2) En el gráfico siguiente se muestra el efecto del ATP sobre la enzima alostérica fosfofructoquinasa. A una concentración determinada de fructosa-6-fosfato, la actividad de la fosfofructoquinasa aumenta al aumentar las concentraciones de ATP, pero se alcanza un punto más allá del cual el incremento de ATP produce inhibición de la enzima.

a) Explicar cómo el ATP puede ser sustrato e inhibidor de la fosfofructoquinasa. ¿De qué modo está regulada la glucólisis por los niveles de ATP?

b) La inhibición de la fosfofructoquinasa por el ATP disminuye cuando la concentración de ADP es elevada. ¿Cómo puede explicarse esta observación?



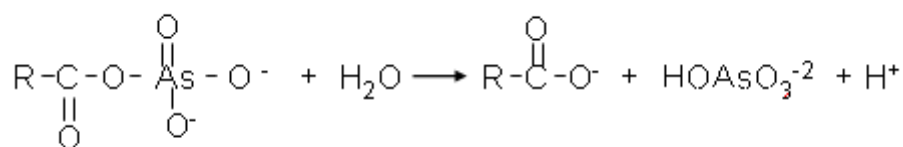
3) En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con ^{14}C en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica (NaN_3) a $\text{pH}=5$ y a 30°C . Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células ($t=0$) y luego de 1h de incubación se muestran en la siguiente tabla:

t (min)	% de radiactividad	
	tubo A	tubo B
0	100	100
60	98	65

- a) ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- b) Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones pero con 1- ^{14}C glucosa.

4) Durante una actividad agotadora el tejido muscular demanda grandes cantidades de ATP en comparación con el tejido en reposo. En el músculo esquelético blanco, por ejemplo el músculo volador del pavo, este ATP se produce casi exclusivamente por glucólisis anaerobia. Supóngase que el músculo esquelético blanco carece de lactato deshidrogenasa, ¿podría efectuar una actividad física violenta que implique producir ATP por la vía glicolítica a velocidad elevada? Justifique su respuesta.

5) Como el arseniato es semejante al fosfato (P_i) química y estructuralmente, muchas enzimas que precisan de P_i , emplearán también el arseniato. Los compuestos orgánicos de arsénico son menos estables que los compuestos análogos de fósforo. Por ejemplo los acil-arseniatos se descomponen rápidamente por hidrólisis aún en ausencia de catalizadores.



Por otra parte, los fosfatos de acilo tales como el 1,3 difosfoglicerato, son más estables y se transforman en la célula mediante acción enzimática.

- a) Predecir el efecto sobre la reacción neta catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa si el fosfato del gliceraldehído se sustituye por arseniato.
- b) ¿Cuál sería la consecuencia para un organismo si el fosfato fuese sustituido por arseniato?

PROBLEMAS COMPLEMENTARIOS

1) La fructosa se encuentra en el semen bovino y humano en concentraciones de hasta 12 mM. El espermatozoide emplea la fructosa anaeróbicamente para producir el ATP que necesita para el movimiento flagelar. La ruta catabólica principal de fructosa a lactato en esta célula prescinde de la reacción de la vía glicolítica catalizada por fosfofructoquinasa, y emplea una enzima que escinde la fructosa-1-fosfato en dos compuestos de tres carbonos.

Escriba las reacciones implicadas en el catabolismo anaerobio de fructosa hasta lactato.

2) ¿Qué reacción catalizan las glucoquinasa y la hexoquinasa? ¿Qué sentido metabólico tiene la distribución diferencial de estas enzimas en los tejidos de los mamíferos? Recordar que glucoquinasa está presente en el hígado, mientras que en el cerebro y en otros tejidos está presente hexoquinasa.

GUÍA DE ESTUDIO**Vía glicolítica:**

- Esquema con fórmulas de las reacciones, enzimas y cofactores.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?
- Acción de la hexoquinasa y de la glucoquinasa: sustrato sobre el cual actúan, producto de la reacción que catalizan. Diferencia en los valores de K_m .
- Función de los grupos fosfato en los intermediarios.
- ¿Cuáles son los monosacáridos más comunes que pueden ingresar a la vía glicolítica?
- Balance energético: producción neta de ATP por degradación de glucosa a piruvato.

Regulación:

- Puntos de regulación de la vía glicolítica: enzimas implicadas.
- ¿Qué compuestos activan o inhiben las enzimas que intervienen en la regulación?
- Efecto Pasteur como mecanismo de adaptación celular.

Destino del piruvato

- Fermentación alcohólica y láctica: productos, enzimas y cofactores. Rendimiento energético. Formulación de las reacciones implicadas.